زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

اثر کلسیم بر پایداری ترمولیزین

محسن عیسی‌زاده زارع[1]، سید محسن اصغری[2*]، مجید تقدیر[3]، عبدالعلی وارسته[4]، الهام عصاره دزفولی[1]

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
2- استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
3- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4- دکترای بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* کدپستی 41938-33697، رشت، ایران
sm_asghari@guilan.ac.ir
(دریافت مقاله: 92/5/6، پذیرش: 92/5/13)

چکیده- ترمولیزین یک پروتئاز پایدار دمایی حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس می‌باشد. این آنزیم از نظر صنعتی مهم بوده و بویژه در سنتز پپتید کاربرد دارد. با توجه به کاربردهای صنعتی ترمولیزین، مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده است. در تحقیق حاضر، نقش کلسیم در پایداری دمایی، pH اسیدی، در برابر عوامل دناتوره کننده (اوره و SDS) و نمک NaCl مطالعه گردید. پارامتر $t_{1/2}$ در عدم حضور کلسیم، در دماهای 80 ، 85 و 90 درجه سانتی‌گراد به ترتیب 7، 3 و 1 دقیقه، اما در حضور کلسیم به ترتیب 95>، 45 و 16 دقیقه بود. کلسیم تأثیر چندانی بر پایداری آنزیم در pH اسیدی نداشته است. همچنین، بررسی اثر دناتورانت‌ها نتایج متفاوتی نشان می‌دهد. در مورد SDS، درصدی از دناتورانت که فعالیت آنزیم را به نصف رساند، در عدم حضور کلسیم 0/1 و در حضور کلسیم 0/9 درصد (W/V) بود. اما در اوره، فعالیت آنزیم در حضور دناتورانت نه‌تنها دچار کاهش نشد، بلکه با افزایش روبرو شد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین حالات حضور و عدم حضور کلسیم مشاهده نشد. تا غلظت 3 مولار NaCl، پایداری ترمولیزین در حضور کلسیم افزایش و در عدم حضور کلسیم اندکی کاهش یافته است. اما در غلظت بالاتر NaCl کاهش پایداری در هر دو مورد دیده شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که پایداری دمایی ترمولیزین و پایداری در برابر SDS به‌شدت وابسته به کلسیم می‌باشد، پایداری در برابر اوره و NaCl وابستگی نسبی به کلسیم را نشان می‌دهد و در pH اسیدی، پایداری آنزیم وابستگی به کلسیم ندارد.

کلید واژگان: ترمولیزین، پایداری، کلسیم، دناتورانت، pH.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

1- مقدمه

پروتئازها کاربردهای گوناگونی در ساخت پپتید، تعیین توالی پروتئین، صنایع غذایی، دارویی و شوینده‌ها دارند [1]. این آنزیم‌ها پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها را در محیط آبی هیدرولیز کرده و به همین خاطر در خانوادهٔ هیدرولازها قرار می‌گیرند [2]. در محیط‌های آلی به خاطر تغییر معادله‌ی ترمودینامیکی، پیوندهای پپتیدی ساخته می‌شود [3 و 4]. سایر کاربردهای این آنزیم‌ها وابسته به ماهیت فعالیت کاتالیتیک در ارتباط با محیط واکنش‌دهنده است که منجر به‌دسته‌بندی پروتئازها به گروه‌های اسیدی، خنثی و بازی می‌شود [5]. پروتئازهای خانواده ترمولیزین (TLPs) یا پروتئازهای خنثی که به وسیله انواع باسیلوس‌ها تولید می‌شوند، با داشتن فعالیت بهینه در pH خنثی شناخته می‌شوند [6]. فعالیت کاتالیتیک این آنزیم‌ها وابسته به یک یون روی است که در جایگاه فعال قرار دارد. پروتئازهای خنثی به تعداد متفاوتی از یون‌های کلسیم اتصال دارند که برای پایداری آنزیم ضروری است [7]. همهٔ این پروتئازها با دو یون کلسیم در یک جایگاه اتصال دوتایی پیوند دارند، در حالی‌که پروتئازهای پایدارتر مانند ترمولیزین، چهار یون کلسیم ساختاری دارند [8]. ترمولیزین [EC 3.4.24.27]، پروتئاز خارج سلولی تولیدشده به‌وسیله‌ی *باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس* است که یک آنزیم پایدار دمایی است [9]. این آنزیم به‌عنوان آنزیم مهم صنعتی شناخته می‌شود که در سال‌های گذشته نقش مهمی در تولید آسپارتام به‌عنوان شیرین‌کننده مصنوعی داشته [10] و اکنون مهم‌ترین کاربرد آن، در تشکیل پیوندهای پپتیدی است [11 و 12]؛ به همین خاطر، بررسی و مهندسی ترمولیزین برای بهبود ویژگی‌های آنزیمی، از دیرباز مورد توجه پژوهشگران بوده است. در این پژوهش، اثر کلسیم بر پایداری و ویژگی‌های بیوشیمیایی ترمولیزین بررسی شده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما و SDS، اوره، کازئین، $CaCl_2$ و سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک آلمان خریده شد.

2-2- سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت ترمولیزین با اسپکتروفوتومتری و تعیین مقدار جذب در طول موج 280 nm و با روش Endpoint تعیین شد. پیش‌ماده‌ی استفاده شده برای واکنش، کازئین 1 درصد (W/V) بود. از تریس 20 میلی‌مولار با pH = 7/5 به‌عنوان بافر و از TCA 10 درصد به‌عنوان متوقف‌کننده واکنش استفاده شد. واکنش پروتئولیز، 10 دقیقه در 60 درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از پایان واکنش، به اندازه حجم محیط سنجش (250 µl)، TCA اضافه شد. پس از متوقف کردن واکنش، مقدار جذب در طول موج 280 nm به‌عنوان فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. برای به‌دست آوردن Unit آنزیم، منحنی استاندارد غلظت‌های کازئین رسم شد.

2-3- غیرفعال‌سازی حرارتی

برای تعیین پایداری ترمودینامیکی و پایداری سینتیکی، ترمولیزین در 80 ، 85 و90 درجه سانتی‌گراد و در بازه 0- 90 دقیقه دمادهی شد. انکوباسیون در حضور و نبود کلسیم انجام شد. در زمان‌های مشخص (0- 90 دقیقه) نمونه‌ها برداشته و فوراً به یخ انتقال داده شدند. پس از 30 دقیقه دمادهی در یخ، فعالیت آنزیمی پیش‌ماده کازئین 1

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

درصد ارزیابی شد. با به‌دست آوردن میزان فعالیت در زمان‌های انکوباسیون مختلف برای هر دما، منحنی لگاریتم فعالیت باقیمانده بر زمان به صورت خطی به‌دست آمد. زمان صفر انکوباسیون شاهد (100درصد) در نظر گرفته شد. با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم، پارامتر $t_{1/2}$ در دماهای مختلف محاسبه شد. همچنین با استفاده از ثابت سرعت غیرفعال‌سازی ($k_{inactivation}$) که در واقع شیب خط نمودار غیرفعال‌سازی در 80، 85 و 90 درجه سانتی‌گراد است، منحنی آرنیوس رسم شد. با استفاده از منحنی آرنیوس، نخست، انرژی فعال‌سازی (E_a) بر پایه‌ی معادله آرنیوس (Arrhenius) تعیین شد:

$$k = A\, e^{-Ea/RT}$$

k (s^{-1})، ثابت سرعت در دمای T، A، فاکتور pre-exponential مربوط به آثار استری و شدت تصادم مولکولی، R، ثابت گازها (8.314 J/mol.K) و E_a، انرژی فعال‌سازی واکنش است. بنابراین منحنی ln فعالیت ویژه بر 1/T، یک خط با شیب $-E_a/R$ به‌دست می‌دهد. پارامتر ترمودینامیکی $\Delta G^{\#}$ از رابطه زیر تعیین شد:

$$\Delta G^{\#} = (RT \ln k_B T/h) - (RT \ln k_{inact})$$

k_B، ثابت بولتزمن (1.3805×10^{-23} $J.K^{-1}$)، h، ثابت پلانک (6.6256×10^{-34} J.S) و k_{inact}، ثابت سرعت غیرفعال‌سازی بر اساس مقدار به‌دست آمده در 85 درجه سانتی‌گراد است. با انرژی فعال‌سازی، میزان آنتالپی فعال‌سازی واکنش دناتوراسیون ($\Delta H^{\#}$) با رابطه $\Delta H^{\#} = E_a - RT$ تعیین شد. میزان $\Delta S^{\#}$ نیز با داشتن مقادیر $\Delta H^{\#}$ و $\Delta G^{\#}$ و با استفاده از رابطه $\Delta S^{\#} = (\Delta H^{\#} - \Delta G^{\#})/T$ تعیین شد. دما در روابط بالا، 85 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

2-4- اثر pH اسیدی روی فعالیت آنزیم

برای بررسی اثر pH اسیدی و نقش کلسیم، آنزیم در بازه 0-45 دقیقه در pH=3 به‌عنوان یک pH شاخص اسیدی دمادهی شد. دمادهی در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) و در سه غلظت کلسیم (0، 2 و 10 میلی‌مولار) انجام شد. پس از پایان دمادهی، فعالیت آنزیم سنجیده شد. فعالیت به‌دست آمده از دمادهی در زمان صفر به‌عنوان شاهد (100درصد) در نظر گرفته شد.

2-5- اثر غلظت‌های مختلف دناتورانت‌ها و NaCl بر روی فعالیت

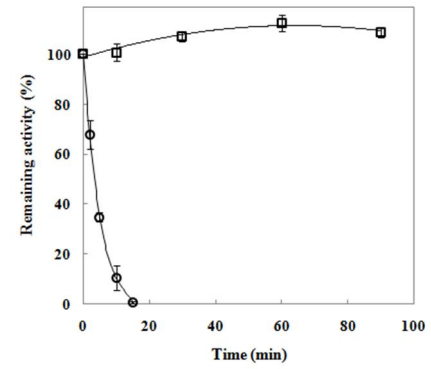
پس از دمادهی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف SDS و اوره به‌عنوان دناتورانت و نمک NaCl در 37 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم سنجیده شد. دمادهی در دو غلظت کلسیم (0 و 20 میلی‌مولار) انجام شد. فعالیت آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر دناتورانت‌ها و نمک به‌عنوان شاهد (100 درصد) در نظر گرفته شد.

3- یافته‌ها

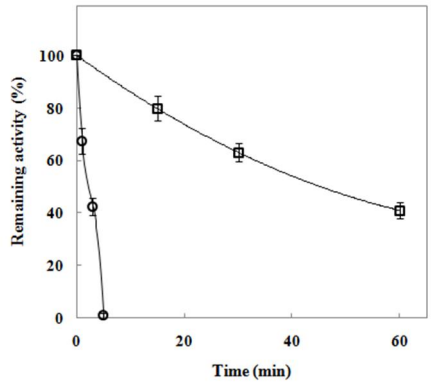
3-1- غیرفعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر ترمولیزین

غیرفعال شدن حرارتی آنزیم ترمولیزین در دماهای 80، 85 و 90 درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی شد. داده‌های به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم ترمولیزین، پس از دمادهی در دماهای گفته شده، در شکل 1 آمده است.

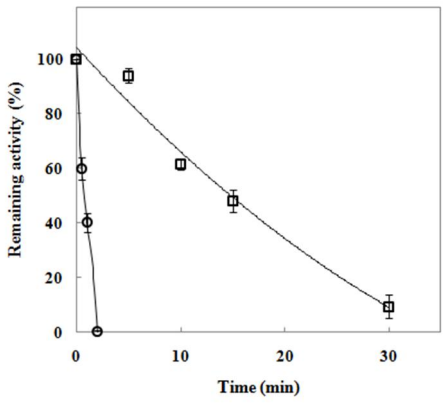
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]



(الف)



(ب)



(ج)

شکل 1 غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در (الف) 80، (ب) 85 و (ج) 90 درجه‌ی سانتی‌گراد و در غلظت‌های 0 (○) و 20 (□) میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.

برای بیان کمی میزان پایداری حرارتی ترمولیزین، پارامتر $t_{1/2}$ (نیمه‌عمر غیرفعال‌سازی) در دماهای مختلف بر اساس داده‌های شکل 1 تعیین شد (جدول 1). بر اساس داده‌ها، با افزایش دمای دمادهی، نیمه‌عمر غیرفعال‌سازی آنزیم کاهش یافته است.

جدول 1 نیمه‌عمر غیرفعال‌سازی ($t_{1/2}$) ترمولیزین در دماهای مختلف

دما (درجه سانتی‌گراد)	80		85		90	
غلظت $CaCl_2$ (میلی‌مولار)	0	20	0	20	0	20
$t_{1/2}$ (دقیقه)	7	>95	3	45	1	16

با به‌دست آوردن ثابت سرعت غیرفعال‌سازی ($k_{inactivation}$) ترمولیزین در 80، 85 و 90 درجه سانتی‌گراد، نمودار آرنیوس غیرفعال‌سازی حرارتی رسم شد. با استفاده از نمودار آرنیوس، نخست پارامتر انرژی فعال‌سازی (E_a) به‌دست آمد. با داشتن انرژی فعال‌سازی، میزان آنتالپی فعال‌سازی واکنش دناتوراسیون ($\Delta H^{\#}$)، و $\Delta G^{\#}$ واکنش دناتوراسیون در 85 درجه سانتی‌گراد و میزان $\Delta S^{\#}$ با استفاده از روابط گفته شده در بخش مواد و روش‌ها، تعیین شد (جدول 2).

جدول 2 پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در 85 درجه سانتی‌گراد

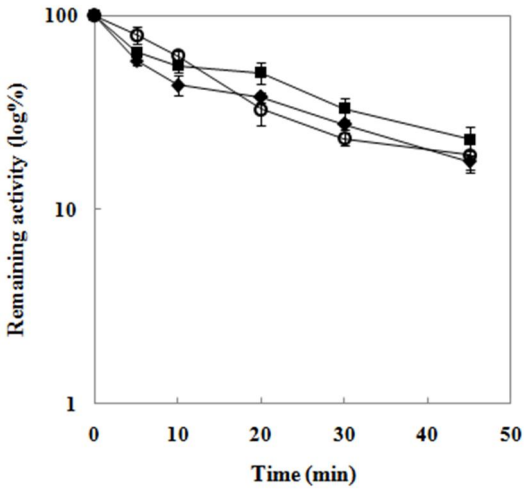
غلظت کلسیم (میلی مولار)	$k_{inactivation}$ ($s^{-1} \times 10^3$)	E_a (kcal/mol)	$\Delta H^{\#}$ (kcal/mol)	$\Delta G^{\#}$ (kcal/mol)	$\Delta S^{\#}$ (cal/mol.K^{-1})
0	387	57/4	56/7	21/2	415
20	6	103/6	102/9	24/1	920/6

3-2- اثر pH اسیدی بر فعالیت ترمولیزین

فعالیت آنزیم ترمولیزین در pH=3 به‌عنوان یک pH شاخص اسیدی سنجیده شد. نتایج سنجش فعالیت آنزیم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

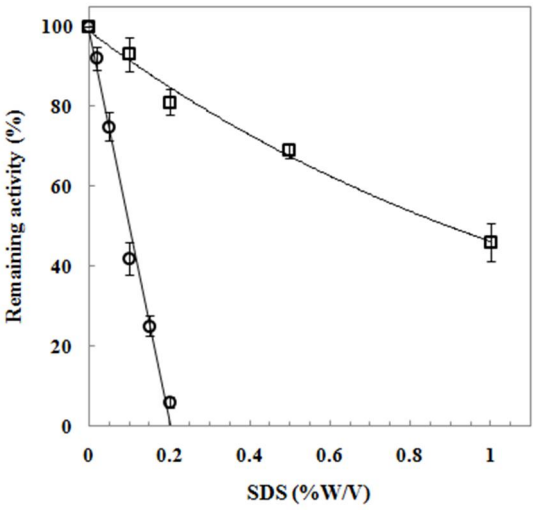
در غلظت‌های مختلف کلسیم در شکل 2 آمده است. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف کلسیم، تفاوت معناداری ندارد.



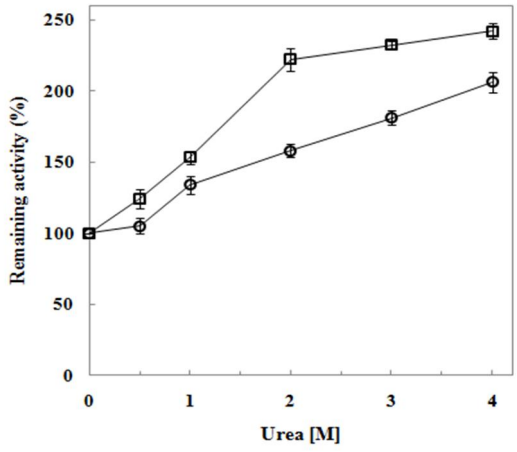
شکل 2 اثر pH = 3 بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○)، 2 (♦) و 10 (■) میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار کمتر از 5 درصد بوده است.

3-3- اثر دناتورانت‌ها بر روی فعالیت ترمولیزین

اثر دو دناتورانت SDS و اوره بر فعالیت ترمولیزین در شکل 3 و 4 دیده می‌شود. SDS با غلظت 0/2 درصد و در نبود کلسیم، فعالیت آنزیم را به صفر رساند، در حالی‌که در غلظت 1 درصد SDS و در حضور کلسیم 20 میلی‌مولار، 46 درصد فعالیت باقی‌مانده دیده شد. در غلظت‌های مختلف اوره، فعالیت آنزیم نه تنها کاهش نداشت، بلکه با افزایش غلظت اوره تا 4 مولار، فعالیت آنزیم افزایش یافت؛ به گونه‌ای که افزایش فعالیت دیده شده در حضور کلسیم، اندکی بیشتر بود.



شکل 3 اثر درصدهای مختلف SDS بر فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○) و 20 (□) میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.

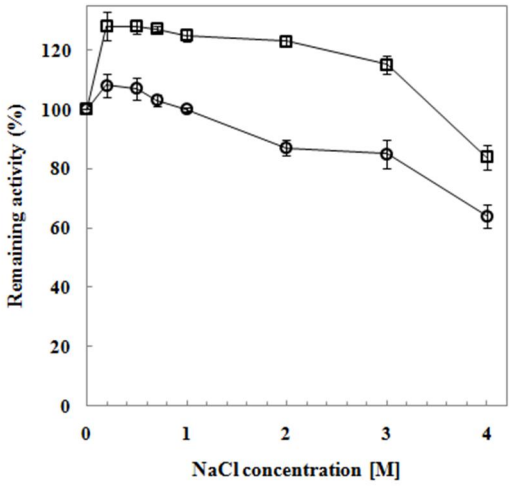


شکل 4 اثر غلظت‌های مختلف اوره بر فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○) و 20 (□) میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از چهار تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

3-4- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر روی فعالیت ترمولیزین

در فرایند ساخت پپتید با ترمولیزین، محیط واکنش، غلظت بالای NaCl دارد [11]؛ بنابراین، پایداری ترمولیزین در حضور این نمک اهمیت زیادی دارد و مورد توجه است. در این بخش، اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت ترمولیزین، در حضور و نبود کلسیم بررسی شد. همان‌گونه که در شکل 5 دیده می‌شود، در حضور و نبود کلسیم، فعالیت آنزیم در غلظت‌های پایین نمک، افزایش، اما در غلظت‌های بالای نمک با کاهش روبرو می‌شود. در همه‌ی غلظت‌های نمک، فعالیت ترمولیزین در حضور کلسیم بیش از نبود آن است.



شکل 5 اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○) و 20 (□) میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از چهار تکرار کمتر از 5 درصد بوده است.

4- بحث

کلسیم در پایداری آنزیم‌ها به ویژه آنزیم‌های خارج سلولی، نقش مهمی دارد. ترمولیزین به‌عنوان یک پروتئاز خارج سلولی، 4 جایگاه اتصال کلسیم Ca1-Ca4 دارد. اعتقاد بر این است که در این میان، جایگاه Ca3 تمایل کمتری برای اتصال به کلسیم دارد و همین جایگاه است که مهم‌ترین نقش را در آنزیم‌های ترمولیزین باسیلوسی بر عهده دارد [7، 13].

در این پژوهش، بررسی پایداری حرارتی در حضور و نبود کلسیم، نشان داد که پایداری به شدت تحت اثر کلسیم قرار می‌گیرد. عامل ناپایداری حرارتی در دماهای بالا، پدیده اتولیز است [8]. به نظر می‌رسد که وصل نشدن کلسیم به جایگاه Ca3 موجب افزایش پویایی پروتئین در این جایگاه شده و غیرفعال‌شدن سریع آنزیم در دماهای بالا را به دنبال دارد؛ در حالی که در حضور کلسیم، احتمال اتصال به این جایگاه، افزایش یافته و یون کلسیم با استحکام بخشیدن به این ناحیه، آنزیم را از اتولیز محافظت می‌کند. برای نمونه، $t_{1/2}$ در دمای 85 درجه در حضور کلسیم، 15 برابر بیشتر از عدم حضور کلسیم است.

در پایداری pH، تفاوت بین دو حالت حضور و نبود کلسیم، معنی‌دار نیست و این موضوع پیشنهاد می‌کند که سازوکارهای دناتوراسیون pH با دناتوراسیون گرمایی متفاوت است. به عبارتی، اتصال کلسیم به جایگاه Ca3، در پایداری آنزیم نسبت به pHهای اسیدی نقش چندانی ندارد.

در مورد اثر کلسیم بر پایداری آنزیم در حضور دناتورانت SDS، نتایج همانند دناتوراسیون گرمایی است. بررسی‌های پیشین روی آنزیم شبه-ترمولیزین به‌دست آمده از *باسیلوس استئاروترموفیلوس* هم نتایج مشابهی را نشان داده است [14]؛ به‌گونه‌ای که با مهندسی پروتئین، پایداری دمایی و پایداری نسبت به SDS، هم‌زمان در این آنزیم افزایش یافته است. پیشنهاد می‌شود که هسته

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

دناتوراسیون پروتئین در هر دو نـوع پدیـده دناتوراسـیون حرارتی و دناتوراسیون با SDS، بخشی یگانـه از پـروتئین است. نتیجه جالب توجه این پژوهش، اثر اوره بر فعالیـت آنزیم است. نتایج نشان داده اسـت کـه در هـر دو حالـت حضور و نبود کلسیم، اوره موجب افزایش فعالیـت آنـزیم می‌شود. درحالی که انتظـار مـی‌رود افـزایش غلظـت اوره به‌عنوان یک دناتوره‌کننده، موجب کـاهش فعالیـت آنـزیم شود. پیشنهاد می‌شود که اوره، با تأثیری که روی کـازئین، به‌عنوان یک پـیش‌مـاده پروتئینـی دارد، باعـث دسترسـی آسان‌تر آنزیم به جایگاه‌های برش پیش‌ماده شـده و بـدین ترتیب، فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد.

در مورد اثر نمک NaCl بر پایداری آنزیم، نتایج نشـان داد که پایداری ترمولیزین در حضور غلظت‌های مختلـف نمک، کاهش چشم‌گیری نداشـته و تفـاوت انـدکی میـان حالات حضور و نبود کلسیم دیده می‌شود، به گونه‌ای کـه می توان گفت در نبود کلسیم نیز، آنزیم فعالیـت خـود را حفظ می‌کند؛ بنابراین، دلیل حفظ پایداری در غلظت‌هـای NaCl، حضور کلسیم نیست.

5- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان بـه خـاطر حمایت مالی و فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی، بسـیار سپاسگزارند.

6- مراجع

[1] Gupta, M. N., Roy, I. (2004) Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. Eur. J. Biochem. 271,. 2575-2583

[2] Leatherbarrow, R. J., Fersht, AR. (1986) Protein Engineering. Protein Engin. 1,. 7-16

[3] Ogino, H., Yokoo, J., Watanabe, F., Ishikawa, H. (2000) Cloning and Sequencing of a Gene of Organic Solvent-Stable Protease Secreted From Pseudomonas aeruginosa PST-01 and Its Expression in Escherichia coli. Biochemical Eng J. 5,. 191-200

[4] Doukyu, N., Ogino, H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem. Eng. J. 48,. 270-282

[5] Anwar, A., Saleemuddin, M. (1998) Alkaline Protease: A Reveiew, Bioresource Technol. 64,. 175-183

[6] Priest, F. G. (1989) in Biotechnology Handbooks, Plenum Press, New York and London, vol. 2, PP 293-320

[7] Matthews, B. W. (1988) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. Acc. Chem. Res. 21,. 333-340

[8] Dahlquist, F. W., Long, J. W., Bigbee, W. L. (1976) Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. Biochemistry. 15,. 1103-1111

[9] Endo, S. (1962) Studies on protease produced by thermophilic bacteria. J. Ferment. Technol. 40,. 346-353

[10] Furukawa, S. H., Hasegawa, K., Fuke, I., Kittaka, K., Nakakoba, T., Kamiya, N., Goto, M. (2012) Enzymatic synthesis of Z-aspartame in liquefied amino acid substrates. BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. 70,. 84-87

[11] Fernandez, M. M., Margot, A. O., Falender, C. A., Blanch, H. W., Clark, D. S. (1995) Enzymatic synthesis of peptides containing unnatural amino acids. Enzyme and Microbial Technology. 17,. 964-971

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

[12] Trusek-Holownia, A. (2003) Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. Journal of Biotechnology. 102,. 153-163

[13] Weaver, L. H., Kester, W. R., Ten Eyck, L. F., Matthews, B. W. (1976) Structure and stability of thermolysin, in: Symposium on enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, (Zuber ed) Birkhauser-Verlag, Basel, pp. 31

[14] van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G., Eijsink, V. G. H. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. Proc. Natl. Acad. Sci. 95,. 2056-2060

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]